

肝癌細胞株を用いる実験手技

実験目的 : Characterization of hepatoma cell lines

肝癌細胞株 (HepG2 など) を用いて細胞培養の基礎と実際の実験手技を実習する。

細胞培養 (細胞株)

使用する細胞株 :

- HepG2
- Huh7

実験プロトコール

1. 培地の作成

(1) ビンの滅菌

培養用のビンオートクレーブで滅菌する。

(2) 培地にいれるものを混ぜる

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; SIGMA D7777)	13.53 g
Hepes (Final 20mM)	4.76 g
Proline	30 mg
Antibiotics (Penicilin+Streptomycin)	10 ml
Distilled water	800 ml

Mix O/N 4°C

(3) NaHCO₃ (Final 25mM) 2.1g

(4) Adjust to pH7.5 with 10N NaOH

(5) Adjust to 1L with distilled water

(6) Filtration with 0.22µm Millipore filter

2. コンタミ試験

(1) 各ビンから 500µl とり、12 穴プレートに入れる。

(2) 一晩以上 CO₂ インキュベーター内に入れ、検鏡する。

3. 使用時調整

コンタミ試験が終わったら FBS (Fetal Bovine Serum) を 10% となるように加え、培養に使用する。

増殖曲線

1. 細胞をおこす

- 1) 凍結細胞入りのクライオチューブを 37°C でとく。培地 (10%FBS/DMEM) も暖めておく。
- 2) 細胞懸濁液を 15ml コニカルチューブに入れる。ここに培地を 10ml 加える。
- 3) 1000rpm で 5 分間遠心する。
- 4) 遠心後、沈殿に培地を加え、10ml ディッシュに播種する。

2. 細胞を数える。

- 1) 培地を除き、PBS (Phosphate Buffered Saline) を 5ml 加える。全体に行き渡らせた後、PBS を除き、0.05%トリプシン-0.02%EDTA 液 1ml を加え、全体に行き渡らせた後、液を除く。37°C でインキュベートし、細胞が丸くなってきたら (剥がれてきたら) PBS10ml を加えてピペッティングし、15ml コニカルチューブに回収する。
- 2) 1000rpm、5 分間遠心する。遠心後、沈殿に 5ml の PBS を加え、ピペッティングにてほぐす。0.1%トリパンプルー:細胞懸濁液を 3:1 の割合で混合し、血球計算板にいれ、数える。9マス数えた合計/9x4 (希釈率) x10⁴細胞個/ml となる。
- 3) 35mm ディッシュ一枚あたり 1000 細胞を播種する。

3. 増殖曲線を作成する。

- 1) 5mm ディッシュ播種後翌日から 2. と同様の操作で細胞数を数える。
- 2) 時間経過を横軸に、細胞数を縦軸にとり、曲線を作成する。

<応用編>

5-Bromo-2'-deoxyuridine を用いた Labeling Index の測定方法

蛍光抗体法

培養細胞 ホルマリン固定

- 1: 小さなシャーレにPBSを入れ、そこに細胞の生えたカバーグラス⁽¹⁾を静かに移す.
- 2: シャーレを逆さまにしてPBSを捨て、3%ホルマリン（1%ホルムアルデヒド）/PBSを加える. 室温 15分
- 3: 液を捨て、0.2%T r i t o n/PBSを加える. 室温 15分
- 4: P B S w a s h 2分 X4回
- 5: 1%B S A/P B S 室温 10分
- 6: 一次抗体（1%B S A/P B Sで適当に希釈したもの） 100-200 μ l, 室温 60分
- 7: 1%B S A/P B S w a s h 2分 X3回 5分 X1回
- 8: 二次抗体（1%B S A/P B Sで適当に希釈し、15,000rpm-15分以上遠心した上清）100-200 μ l, 室温 30分～
- 9: P B S w a s h 1分 X3回
- 10: 包埋, -20°C保存

(1) 市販のカバーグラスは、一度洗浄した後、滅菌して使用する。
 場合により、細胞外マトリックス等でコートして用いる場合もある

培養細胞 メタノール固定

- 1 小さなシャーレにPBSを入れ、そこに細胞の生えたカバーグラスを静かに移す.
- 2 メタノール（-20°C） 数回入れ換える. -20°C10分
- 3 P B S w a s h
- 4 0.5%T r i t o n X-100/PBS 室温 15分
- 5 P B S w a s h
- 6 1%B S A/P B S 室温 10分
- 7 一次抗体（1%B S A/P B Sで適当に希釈したもの） 100-200 μ l, 室温 60分
- 8 1%B S A/P B S w a s h 2分 X3回 5分 X1回

- 9 二次抗体 (1% BSA/PBS で適当に希釈し, 15,000rpm-15 分以上遠心した上清) 100-200 μ l, 室温 30 分~
- 10: PBS wash 1 分 X 3 回
- 11: 包埋, -20°C 保存

試薬

PBS		(x10 液)
140 mM NaCl	4.0 g	80 g
2.6 mM KCl	0.1 g	2 g
8.1 mM Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1.45 g	29 g
1.5 mM KH ₂ PO ₄	0.1 g	2 g
H ₂ O up to	500 ml	1000 ml

3.7%ホルマリン/PBS

ホルマリン溶液	3ml
PBS	97ml

1% BSA/PBS

BSA	1g
PBS up to	100l

0.2% Triton X/PBS

Triton X-100	0.2ml
PBS	100ml

1% BSA, 0.1% Triton X-100/PBS

BSA	1g
Triton X-100	0.1ml
PBS	100ml

HCMF

NaCl	80g
KCl	4g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1.2g
glucose	10g
HEPES (pH8.0)	23.8g
2N NaOH	24ml
(フェノールレッド	50mg)
H ₂ O up to	1l

Anti fader (J. Immunological Methods)

- 1) p-Phenylenediamine 100mg を PBS 10ml に溶かす(遮光)
 - 2) 90 ml のグリセリンを加え, 良く攪拌する.
 - 3) carbonate-bicarbonate buffer (pH9.0) で, pH8.0 にあわせる. (pH試験紙)
 - 4) 1ml ずつ分注し, -20°C で遮光保存.
- *光を当てると, 茶色に変色する.

腫瘍転移モデルマウスの作成（経脾モデル）

細胞調整

- (1) 移植前日に約 5×10^5 個 (Subconfluent) の細胞を 100mm dish に播種する。
- (2) 移植当日、PBS (Phosphate Buffered Saline) で 3 回洗浄後、0.05%トリプシン-0.02%EDTA 液 1ml を加え、全体に行き渡らせた後、液を除く。37°C でインキュベートし、細胞が丸くなってきたら (剥がれてきたら) PBS10ml を加えてピペッティングし、15ml コニカルチューブに回収する。
- (3) 1000rpm、5 分間遠心する。遠心後、沈殿に 5ml の PBS を加え、ピペッティングにてほぐし、生細胞数を計測する。1~ 5×10^5 個/ml になるように調整する。

移植

- (1) ネンブタールを生理食塩水で 10 倍に希釈する。マウスの体重を計量し、0.1ml/10g 体重を i. v. する。
- (2) 細胞浮遊液 0.1ml を 27 ゲージ注射針付きシリンジにとる。
- (3) 左脇腹を 70%EtOH で消毒し、皮膚のみ 1cm 切開する。マウスを手へのせ、指で腹部を圧迫しながら切開した部位に脾臓が見えるようにする。ピンセットで腹膜と一緒に脾臓をつかんだ状態でマウスを台上におろし、細胞をゆっくり注入する。
- (4) 注入後、切開した皮膚を縫う。
- (5) 2 週間後、剖検し肝を摘出後水洗いし、重量を測定する。
- (6) 摘出した肝臓は凍結切片用、RNA 抽出用など用途別に処理する。